Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 427-437

Expression of Serine Biosynthesis Pathway Genes in Breast Muscles of Iranian Native Turkeys with Divergent Feed Efficiency

Zahra Pezeshkian[1], Seyed Ziaeddin Mirhoseini[2*], Shahrokh Ghovvati[3], Esmaeil Ebrahimie[4]

Received: 16-01-2022 Revised: 06-02-2022 Accepted: 12-02-2022 Available Online: 13-11-2022	**How to cite this article:** Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., Ghovvati, S. H., & Ebrahimie, E. (2022). Expression of serine biosynthesis pathway genes in breast muscles of Iranian native turkeys with divergent feed efficiency. *Iranian Journal of Animal Science Research, 14*(3), 427-437. DOI: 10.22067/ijasr.2022.74768.1061

Introduction: Feed is the main cost part of poultry production. High feed efficiency poultry produce less feed and less excrement per unit weight gain. Therefore, a comprehensive understanding of the biological mechanisms that control feed efficiency is crucial for the development of optimal breeding and selection strategies. The serine biosynthesis pathway is one of the most important pathways in animals with high feed efficiency. The aim of this study was to investigate the expression of PHGDH, PSAT1 and PSPH genes by real-time PCR in Iranian native turkeys with high and low feed efficiencies.

Materials and Methods: Iranian native male turkeys (n=500) were reared up to 20 weeks of age under standard production guidelines. Then 75 turkeys were randomly selected and placed in separate cages with free access to water and feed from 20 to 24 weeks. Turkeys were ranked based on feed conversion ratio (FCR) and three turkeys with the highest and three turkeys with lowest feed efficiency were selected as high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE) birds, respectively. After slaughter of turkeys, RNA was extracted from breast tissue. Quantity and purity of the extracted RNAs were determined using a nanodrop device and its quality was evaluated using 1% agarose gel electrophoresis. Sequences of PSPH, PHGDH, PSAT1 and RPS7 genes were collected from the NCBI database. The primer was designed using Primer Premier version 5 software. All primers were synthesized by Sinaclon (Iran). In this study, RPS7 gene was used as a reference gene. Then, cDNA synthesis was performed. The best amplification temperature for simultaneous amplification of target and reference genes was determined. Samples were amplified for each gene with 3 replications using real-time PCR reaction. Significance level between treatments for each gene was determined separately using t-test in SAS software version 9.2 ($P<0.05$).

Results and Discussion: Results of ultraviolet light absorption measurements at 260 and 280 nm by the nanodrop device showed that the quantity and quality of RNA extracted from the breast muscle samples were of high purity and not contaminated. The range of RNA concentration of the extracted samples was between 480 to 962 ng/µl and the ratio of absorption at 260 and 280 wavelength was about 2.1, which indicates the good quality of the extracted RNAs. The most suitable temperature was selected for specific binding of primers and simultaneous amplification of target genes and temperature control of 58 °C. To investigate and confirm the specificity of replication, melting curves were created to ensure the specificity of the amplified products, the absence of non-specific bands and secondary structures such as hairpin and primer-dimer structures. The results showed that there was only one narrow peak for each gene. The results of studying the expression of serine biosynthesis pathway genes (PSPH, PHGDH and PSAT1) showed that the expression level of these genes in HFE male turkeys was significantly higher than LFE male. Higher expression of PSPH, PHGDH and PSAT1 genes in HFE animals than in LFE animals indicates activation of the serine amino acid biosynthesis pathway, which itself can provide precursors for the Krebs cycle and purine biosynthesis. Glucose is the main source of metabolic energy in the body. When glucose enters the cell, glycolysis begins in the cytoplasm. The pathway of glycolysis and Glutamine catabolism produces an intermediate metabolite called 3-phosphoglycerate, which is gradually

---

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
2- Professor, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
4- Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Shiraz University, Shiraz, Fars, Iran.
(*-Corresponding Author Email: mirhosin@guilan.ac.ir)

catalyzed to serine by PHGDH, PSAT1, and PSPH. Eventually serine is converted to glycine. Activation of this pathway indicates the higher ability of HFE animals to make better use of energy sources such as glucose, which increases protein production in breast muscle tissue and enhances volume and weight of muscle tissue in HFE turkeys.

Conclusion: The results of this study showed that the expression of serine biosynthesis pathway genes (PSPH, PHGDH and PSAT1) was significantly higher in high feed efficiency turkeys than in low feed efficiency turkeys. In fact, these results at the level of molecular biology show that turkeys with higher feed efficiency cultivate better use of energy received from feed. Activation of this pathway increases the biosynthesis of various amino acids and thus increases protein and muscle mass in birds. The results of this study can be a promising window to introduce genes that affect feed efficiency in order to further investigate the population and larger flocks of birds.

Keywords: Feed efficiency, Gene expression, Real-time PCR, Serine biosynthesis, Turkey.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در ماهیچه سینه بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت

زهرا پزشکیان[۱]، سید ضیا الدین میرحسینی[۲*]، شاهرخ قوتی[۳]، اسماعیل ابراهیمی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

پزشکیان، ز.، میرحسینی، س.ض.، قوتی، ش.، و ابراهیمی، ا. (۱۴۰۱). بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در ماهیچه سینه بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۴۳۷-۴۲۷.

چکیده

خوراک اصلی‌ترین بخش هزینه‌ای در تولید طیور محسوب می‌شود. طیور با بازده غذایی بالا، برای هر واحد افزایش وزن، خوراک کمتری مصرف و مدفوع کمتری نیز تولید می‌کنند. مسیر بیوسنتز سرین یکی از مسیرهای مهم در حیوانات با بازده غذایی بالا است. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های PHGDH، PSAT1 و PSPH توسط روش Real-time PCR در بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی بالا و پایین است. تعداد ۷۵ بوقلمون نر بومی از بین ۵۰۰ بوقلمون نر به‌صورت تصادفی انتخاب و از هفته ۲۰ الی ۲۴ در قفس‌های جداگانه با دسترسی آزاد به آب و خوراک قرار گرفتند. بوقلمون‌ها بر اساس ضریب تبدیل خوراک (FCR) رتبه‌بندی شدند و سه بوقلمون با پایین ترین و سه بوقلمون با بالاترین ضریب تبدیل خوراک به‌ترتیب به‌عنوان پرندگان بازده غذایی بالا (HFE) و بازده غذایی پایین (LFE) انتخاب شدند. بعد از کشتار و استخراج RNA از بافت سینه، سنتز cDNA و آزمون Real-time PCR انجام شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در بوقلمون‌های نر با بازده غذایی بالا به‌طور معنی‌داری بیشتر از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین بود. فعال شدن این مسیر نشان‌دهنده توانایی بالاتر حیوانات با بازده غذایی بالا در استفاده بهتر از منابع انرژی مانند گلوکز است که موجب افزایش پروتئین‌سازی در بافت عضله سینه می‌شود و انرژی به‌دست آمده صرف افزایش وزن بافت عضله در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بوقلمون، بیان ژن، بیوسنتز سرین، بازده غذایی، Real-time PCR.

مقدمه

هزینه خوراک یکی از اجزای مهم پرورش طیور است که ۷۰ درصد از کل هزینه‌های تولید را تشکیل می‌دهد (Case *et al.*, 2012). بنابراین، بازده غذایی (FE[۵]) یکی از مهم‌ترین مسائل در برنامه‌های پرورش طیور می‌باشد. بهبود بازده غذایی مصرف خوراک، هزینه تولید، فضولات و آلودگی‌های محیطی را کاهش دهد (Aggrey *et al.*, 2010; Willems, 2014). از طرفی دیگر، در نتیجه پیشرفت ژنتیکی، پرندگان بزرگ‌تر به غذای بیشتری نیاز دارند. با بهبود بازده خوراک

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.
۴- دانشیار، گروه زراعت واصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: mirhosin@guilan.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2022.74768.1061

5- Feed efficiency

پرندگانی وجود خواهند داشت که مانند سایر پرندگان غذا می‌خورند، امّا وزن یا افزایش وزن بیشتری دارند (Case *et al.*, 2012). درک مبنای اساسی برای داشتن توانایی مطلوب پرنده برای تبدیل خوراک به پروتئین گوشت با کیفیت بالا برای تغذیه جمعیت و حفظ سلامت و پایداری حیوان در آینده مهم است (Kong *et al.*, 2011).

بسیاری از تفاوت‌های بیوشیمیایی و عملکردی در یک لاین طیور وجود دارد که به بیان بازده غذایی مربوط می‌شود (Bottje and Carstens, 2009). برای توسعه استراتژی‌های انتخاب کارآمدتر و پایدارتر، بینش‌هایی در مورد اساس بیولوژیکی تفاوت‌ها در بازده غذایی طیور لازم است. گوشت بوقلمون یک منبع پروتئینی ارزشمند در رژیم غذایی افراد است و می‌تواند جایگزین خوبی برای گوشت مرغ باشد. گوشت بوقلمون کلسترول و چربی کمی دارد. این پرنده در برابر بسیاری از بیماری‌ها مقاوم است که باعث کم شدن استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌شود (Salahi, 2014). توده‌های بومی در هر کشور بعنوان یک سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح می‌باشند که حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و با غلبه بر شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند. طیور بومی علاوه‌بر اهمیتی که در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی دارند، یک ذخیره مهم ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور هستند و شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد (Pirani *et al.*, 2010). جمعیت بومی هر گونه به‌علت تنوع بالا، دارای پتانسیل زیادی برای اصلاح نژاد است. همچنین جمعیت‌های بومی در برابر شرایط مختلف محیطی مقاوم هستند و تنوع فنوتیپی بالایی دارند (Ebrahimzadeh-Allahabad *et al.*, 2015).

مقدار خوراک مصرفی و کارآیی تبدیل آن به انرژی قابل استفاده عوامل مهمی در سرعت رشد و ترکیب بدن حیوانات در طول زندگی است. کنترل ژنتیکی مصرف خوراک با بیان ژن‌های کدکننده گروه متنوعی از مولکول‌ها که شامل هورمون‌ها، گیرنده‌ها، آنزیم‌ها، نوروپپتیدها، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های انتقال‌دهنده است، اعمال می‌شود. در طیور، مصرف خوراک به‌طور مرکزی توسط شبکه‌های عصبی در ساقه مغز و هیپوتالاموس کنترل می‌شود که ورودی‌ها را از اجزای کوتاه‌مدت و بلندمدت مجموعه تنظیم انرژی دریافت می‌کنند. سیستم کوتاه‌مدت که به آن سیستم سیری محیطی نیز می‌گویند، میزان مصرف غذا در هر وعده غذایی را تنظیم می‌کند (Richards, 2003).

مطالعه‌ای برای شناسایی تفاوت‌های متابولیکی در گاو با راندمان غذایی واگرا در چندین بافت انجام شد (Artegoitia *et al.*, 2019). متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین یکی از مسیرهای متابولیکی بود که در دوازدهه و بافت چربی معنی‌دار بود. وانگ و کادارمیدین (۲۰۱۹) تجزیه و تحلیل متابولیک را در گاوهای شیری هلشتاین و جرسی با راندمان خوراک بالا و پایین بررسی کردند (Wang and Kadarmideen, 2019). متابولیسم گلایسین، سرین و ترئونین یکی از مسیرهای متابولیکی مهم در این مطالعه گزارش شد. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2017) گزارش داد که مسیر متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین در خوک‌های HFE[1] فراوانی بیشتری دارد. گلوکز منبع اصلی انرژی متابولیک در بدن است. وقتی گلوکز وارد سلول شد، گلیکولیز در سیتوپلاسم شروع می‌شود. مسیر گلیکولیز یک متابولیت میانی، ۳–فسفوگلیسرات را فراهم می‌کند که توسط PHGDH[2]، PSAT1[3] و PSPH[4] به سرین کاتالیز می‌شود (Pan *et al.*, 2021). هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن‌های PHGDH، PSAT1 و PSPH در بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت با استفاده از تکنیک Real-time PCR است.

مواد و روش‌ها

انتخاب حیوانات و نمونه‌برداری

تعداد۵۰۰ بوقلمون نر تا سن ۲۰ هفتگی تحت دستورالعمل استاندارد در ایستگاه تحقیقات بوقلمون کشور (تاتار) واقع در آذربایجان شرقی، پرورش داده شدند. سپس ۷۵ بوقلمون به‌صورت تصادفی انتخاب و به مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گیلان منتقل شدند. بوقلمون‌ها از هفته ۲۰ تا ۲۴ در قفس‌های جداگانه با دسترسی آزادانه به آب و خوراک قرار گرفتند. پرندگان با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی پرورش یافتند. وزن بدن در ابتدا (۲۰ هفتگی) و پایان آزمایش (۲۴ هفتگی) ارزیابی شد. مصرف خوراک با اندازه‌گیری وزن غذای اضافه شده به هر فیدر به‌صورت روزانه و وزن باقیمانده خوراک به‌صورت هفتگی تا پایان دوره آزمایش ثبت شد. ضریب تبدیل خوراک (FCR[5]) به‌صورت زیر محاسبه شد:

معادله (۱)

$$FCR=\frac{FI(g)}{WG(g)}$$

که در آن، FI[6]: کل مصرف خوراک در طول آزمایش و WG[7]:

1- High feed efficiency
2- Phosphoglycerate dehydrogenase
3- Phosphoserine Aminotransferase 1
4- Phosphoserine Phosphatase

5- Feed conversion ratio
6- Feed Intake
7- Weight gain

افزایش وزن بدن طی این مدت است.

در پایان ۲۴ هفتگی بوقلمون‌ها بر اساس FCR رتبه‌بندی شدند و سه بوقلمون با کم‌ترین و سه بوقلمون با بالاترین رتبه FCR به‌ترتیب به‌عنوان پرندگان بازده غذایی بالا (HFE) و بازده غذایی پایین (LFE[1]) انتخاب شدند. پس از کشتار، از بافت ماهیچه سینه هر پرنده نمونه گیری و در تانک ازت ذخیره شد. نمونه بافت‌ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰ – نگهداری شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از بافت سینه بوقلمون‌ها با استفاده از کیت RNeasy Midi شرکت کیاژن آلمان (Cat# 75144) انجام شد. براساس دستورالعمل استاندارد مقدار ۲۵۰ میلی گرم از بافت مورد نظر وزن شد و درون تیوب‌های مربوط به دستگاه تیشولایزر قرار گرفت. نمونه‌ها به‌مدت حدود یک دقیقه با دستگاه تیشولایزر شرکت کیاژن هموژن و همگن شد. استخراج RNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد.

سنجش کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده

کمیت و تعیین خلوص RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ Epoch2 شرکت BioTek ایالات متحده آمریکا سنجیده شد. مقدار ۱/۲ میکرولیتر از آب RNase-free به‌عنوان شاهد و مقدار مشابه از نمونه‌های مورد مطالعه به‌عنوان تیمار در چاهک‌های دستگاه قرارداده شد. غلظت RNA و نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ برای تعیین خلوص و یا آلودگی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفت. بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام شد.

طراحی آغازگر برای ژن‌های مورد نظر

توالی مربوط به ژن‌های PSPH، PHGDH، PSAT1 و RPS7 از پایگاه داده NCBI دانلود شد. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسخه پنج انجام شد (جدول ۱). پس از بررسی ویژگی‌های ساختاری و یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها در NCBI، کلیه آغازگرها توسط شرکت سیناکلون (ایران) سنتز شدند. در این پژوهش از ژن RPS7[2] به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

آماده‌سازی آغازگرها و سنتز cDNA

آماده‌سازی آغازگرها براساس دستورالعمل استاندارد شرکت سازنده صورت گرفت. سنتز و ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo scientific, #K1621) براساس دستورالعمل شرکت سازنده تحت شرایط دمایی ۲۵°C به‌مدت پنج دقیقه، ۴۵°C به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰°C به‌مدت پنج دقیقه انجام شد.

آزمون Real-time PCR

بهترین دمای تکثیر برای تکثیر همزمان ژن‌های هدف و کنترل داخلی با استفاده از گرادیان دمایی دستگاه Real-time PCR شرکت Roche تعیین شد. تکثیر نمونه‌ها برای هرکدام از ژن‌های PSPH، PSAT1، PHGDH و RPS7 با سه تکرار با استفاده از واکنش Real-time PCR و مقادیر ۶/۲۵ میکرولیتر مسترمیکس SinaSYBERBlue 1X(شرکت سیناکلون، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۴/۴۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و یک میکرولیتر نمونه cDNA در حجم کل ۱۲/۷ میکرولیتر با استفاده از برنامه دمایی جدول ۲ انجام شد.

ارزیابی اختصاصیت آغازگرها و محصولات Real-time PCR با استفاده از بررسی منحنی ذوب و الکتروفورز یک درصد انجام شد.

آنالیز نتایج Real-time PCR

آنالیز داده‌های خام برای همه ژن‌های PSPH، PSAT1، PHGDH و RPS7 با استفاده از روش Pfaffle (Pfaffl, 2001) انجام شد. تغییر بیان ژن‌ها در تیمارها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ سنجیده شد. به نحوی که:

معادله (۲)

$$\Delta Ct = Ct(\text{ژن هدف}) - Ct(\text{ژن کنترل داخلی})$$

و

معادله (۳)

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{(PSPH,\ PSAT1\ and\ PHGDH)} - Ct_{(RPS7)})_{HFE} - (Ct_{(PSPH,\ PSAT1\ and\ PHGDH)} - Ct_{(RPS7)})_{LFE}$$

سطح معنی‌داری بین تیمارها برای هر یک از ژن‌ها به تفکیک با استفاده از آزمون t استیودنت در نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 تعیین شد ($P<0.05$).

نتایج و بحث

کمیت و کیفیت RNA

ارزیابی اندازه‌گیری جذب نور فرابنفش در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، توسط دستگاه نانودراپ مشخص نمود که کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از نمونه‌های عضله سینه، خلوص

1- Low feed efficiency

2- Ribosomal protein S7

بـــالا و مطلوب داشته و عاری از آلـودگی بود. دامنه غلظت RNA استخراج شده نمونه‌ها بین ۴۸۰ تا ۹۶۲ نانوگرم در میکرولیتر و نسبت جذب طول موج ۲۶۰/۲۸۰ حدود ۲،۱ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real Time-PCR
Table 1- Primer sequences used for Real-Time PCR

نام ژن Gene name	توالی آغازگرها Primer sequences		اندازه محصول تکثیر شده Amplified product size	کد دسترسی در NCBI Accession code in NCBI
PHGDH	5' CAAAGCATCTGAGACAAACACG 3'	رفت Forward	129	XM_010715700.2
	5' GTTGAGAGCCCGGCTATGC 3'	برگشت Reverse		
PSAT1	5' TATATAACACTCCTCCATGCTACA 3'	رفت Forward	184	XM_019610527.2
	5' CTGCTTCGGTTCTTCTTCTCC 3'	برگشت Reverse		
PSPH	5' GGTTTCAGAGCATCGTGGAG 3'	رفت Forward	226	XM_010721744.3
	5' GCTTCCATGTCTGTAGCTCCATC 3'	برگشت Reverse		
RPS7	5' TGAAGTAGGTGGTGGCAGGAA 3'	رفت Forward	165	NM_001285787.1
	5' CTCGTTGGCTTGGGCAGAA 3'	برگشت Reverse		

جدول ۲- سیکل‌های حرارتی واکنش Real-time PCR
Table 2- Thermal cycles of Real-time PCR reaction

مرحله Step	سیکل‌ها Cycles	درجه حرارت (سانتیگراد) Temperature (˚C)	فرآیند Process	زمان نگهداری (ثانیه) Time (Second)
قبل از تکثیر Pre-amplification	1	94	واسرشت سازی ابتدایی Initial denaturation	180
تکثیر Amplification	40	94	واسرشت سازی Denaturation	30
		59	اتصال Annealing	30
		72	بسط Extension	30
منحنی ذوب Melting curve	1	95	واسرشت سازی Denaturation	10
		65	اتصال Annealing	60
		97	بسط Extension	1

بهینه‌سازی واکنش Real-time PCR

یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن‌های هدف و کنترل واکنش PCR با استفاده از شیب دمایی انجام شد. مناسب‌ترین دما برای اتصال اختصاصی آغازگرها و تکثیر همزمان ژن‌های هدف و کنترل دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید.

بررسی منحنی ذوب و اختصاصیت آغازگرها

برای بررسی و تأیید اختصاصیت تکثیر، منحنی ذوب ایجاد شد تا از اختصاصی بودن محصولات تکثیر شده، عدم وجود باند غیر اختصاصی و ساختارهای ثانویه مانند ساختار سنجاق سری و پرایمر–دایمر اطمینان حاصل شود. نتایج نشان داد که تنها یک پیک بلند و باریک برای هر ژن وجود دارد و نتایج فاقد پیک کوچک‌تر و پهن‌تر از پیک مورد انتظار می‌باشد. بنابراین، نتایج نشان داد که آغازگرها با هم تقابل ندارند و پرایمر دایمر وجود ندارد (شکل ۱).

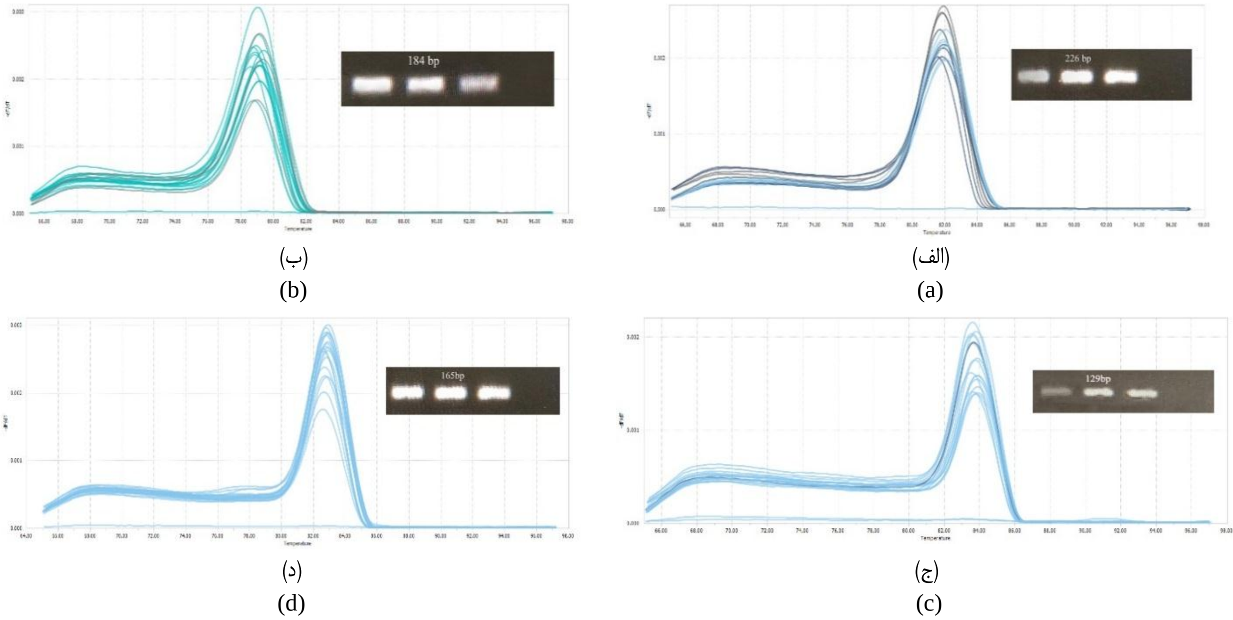
جدول ۳– غلظت و نسبت جذب طول موج 260/280 RNAهای استخراج شده در نمونه‌های عضله سینه

Table 3– RNA concentration and absorption of 260/280 ratio wavelength of in breast muscle samples

نمونه‌ها Samples	غلظت (نانوگرم بر میکرولیتر) Concentration (ng/µl)	نسبت 260/280 260/280 ratio
H[1].1	722.65	2.137
H.2	629.598	2.132
H.3	962.353	2.15
L[2].1	480.531	2.14
L.2	518.764	2.144
L.3	631.453	2.122

[1] H: بوقلمون‌ها با بازده غذایی بالا؛ [2] L: بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین

[1] H: High feed efficiency turkeys
[2] L: Low feed efficiency turkeys

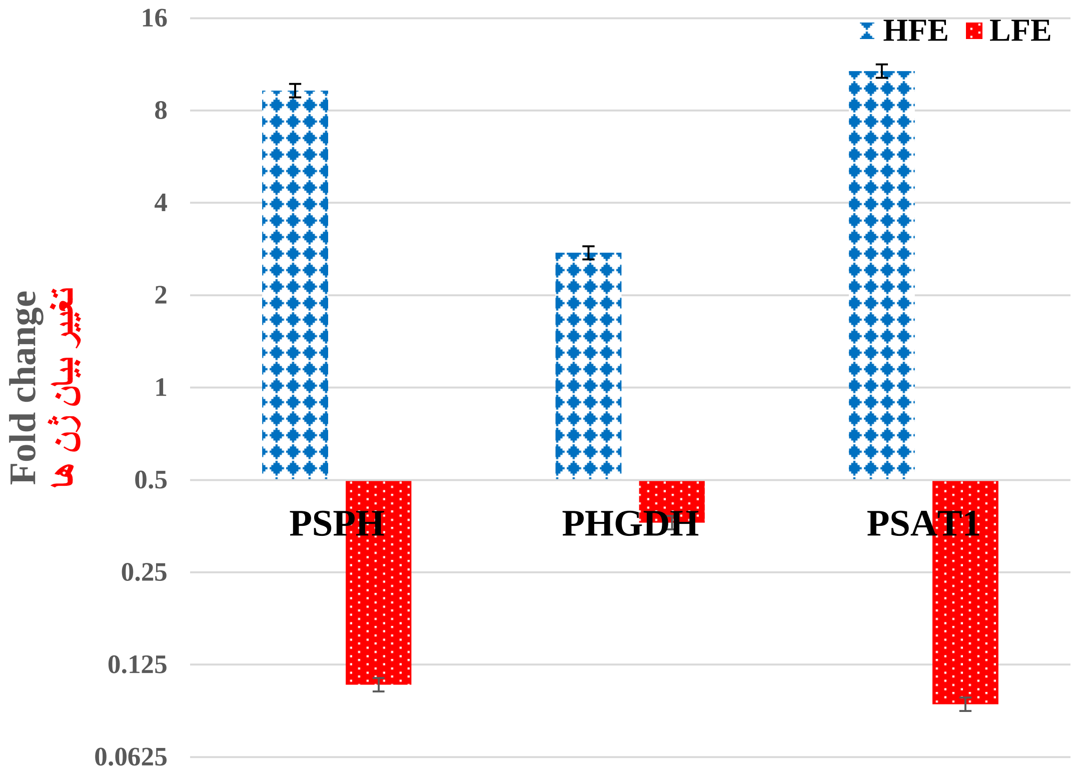


شکل ۱– منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن‌ها و تصویر این محصولات بر روی ژل آگارز. الف) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PSPH، (ب) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PSAT1 و (ج) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PHGDH، (د) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن RPS7

Figure 1- Melting curve of Real-time PCR products of genes and image of these products on agarose gel. a) Melting curve of Real-time PCR products of PSPH gene, (b) Melting curve of Real-time PCR products of PSAT1 gene and (c) Melting curve of Real-time PCR products of PHGDH gene, (d) Melting curve of Real-time PCR products of RPS7 gene

بررسی بیان ژن‌ها:

بیان ژن‌های PSPH، PSAT1 و PHGDH در حیوانات با بازده غذایی بالا و بازده غذایی پایین براساس تعداد کپی mRNA (Ct) هر ژن نسبت به ژن رفرنس با استفاده از Real-time PCR ارزیابی شد. نتایج ارزیابی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین که شامل ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 می‌باشد، نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در بوقلمون‌های نر با بازده غذایی بالا (HFE) به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین (LFE) بیشتر می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲– بیان ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 در بوقلمون‌های بومی نر با بازده غذایی بالا (HFE) و پایین (LFE)

Figure 2 - Expression of PSPH, PHGDH and PSAT1 genes in male native turkeys with high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE)

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR نشان داد که بیان ژن PSPH در حیوانات با بازده غذایی بالا (HFE) ۹/۲۹ افزایش و در حیوانات با بازده غذایی پایین (LFE) کاهش بیان داشت (P<0.05). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR برای ژن PHGDH نشان داد که بیان این ژن در حیوانات HFE ۲/۷ افزایش و در حیوانات LFE کاهش بیان داشت (P<0.05). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR نشان داد که بیان ژن PSAT1 در حیوانات HFE ۱۰/۷۶ افزایش و در حیوانات LFE کاهش بیان داشت (P<0.05).

نتایج این پژوهش ثابت نمودند که بیان ژن PSPH در حیوانات HFE به‌طور معنی‌داری بالاتر از حیوانات LFE است (p<0.05). بیان ژن PHGDH هم در حیوانات HFE به‌طور معنی‌داری بالاتر از حیوانات LFE بود (p<0.05). همچنین نتایج نشان‌دهنده معنی‌دار بودن بیان بالاتر ژن PSAT1 در حیوانات HFE نسبت به LFE می‌باشد (p<0.05). نتایج حاصل از بررسی ژن های مسیر بیوسنتز سرین حاکی از بالاتر بودن معنی‌دار بیان ژن‌های این مسیر در حیوانات با بازده غذایی بالا نسبت به بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین است (p<0.05). بیان ژن PSPH در حیوانات با بازده غذایی بالا چندین برابر حیوانات با بازده غذایی پایین بود که نشان‌دهنده بیان بیشتر این ژن در حیوانات HFE نسبت به LFE می‌باشد. بیان ژن PHGDH در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین بود (p<0.05). ژن PSAT1 بیشترین بیان را در بین سه ژن مسیر بیوسنتز سرین داشت. بیان این ژن هم در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا چندین برابر بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین بود (p<0.05).

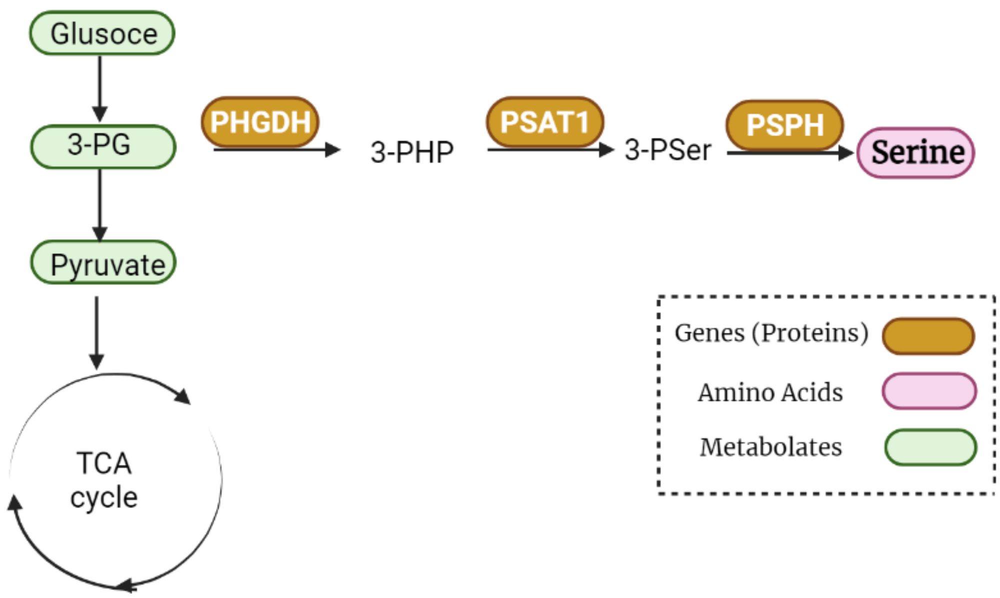
فسفوهیدروکسی ترئونین آمینوترانسفراز (PSAT1) آنزیمی است که مسئول تبدیل ۳- فسفوهیدروکسی پیروات به فسفوسرین است. PSAT1 در بیوسنتز سرین و در نتیجه، در بیوسنتز اسیدهای آمینه دیگر دخیل است. گونگ (Gong, 2010) با استفاده از آنالیز میکروآرایه، مسیرهای سیگنال‌رسانی رشد در ماهیچه اسکلتی گوسفندان را بررسی نمود. نتایج مطالعه وی نشان داد که مسیرهای مرتبط با فعالیت ژن

PSAT1 فعال شده‌اند. فعال شدن این ژن به معنی افزایش سنتز پروتئین و افزایش حجم و وزن عضله است. افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در هایپرتروفی ماهیچه اسکلتی گوسفند نیز گزارش شده است (Parr *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای بر روی گاوهای گوشتی، فونسکا و همکاران (Fonseca *et al.*, 2019) به بررسی پروتئومیکس کبد حیوانات با بازده غذایی بالا و پایین پرداختند. نتایج حاکی از فعال شدن مسیر بیوسنتز اسیدآمینه‌ها و افزایش بیان ژن PSAT1 بود.

فسفوگلیسرات دهیدروژناز (PHGDH) اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز اسیدآمینه سرین است. این آنزیم مسئول تبدیل ۳– فسفوگلیسرات به ۳– هیدروکسی پیروات است. ژو (۲۰۱۵) از تکنیک RNA-Seq برای بررسی اساس بیولوژیکی تنوع بازده غذایی در جوجه‌های گوشتی استفاده کرد. نتایج این مطالعه افزایش بیان ژن‌های PSAT1 و PHGDH و فعال شدن مسیر بیوسنتز سرین را گزارش کرد (Zhou *et al.*, 2015).

فسفوسرین فسفاتاز (PSPH) موجب تبدیل ۳– فسفوسرین به اسیدآمینه سرین می‌شود. این آنزیم نیز نقش مهمی در بیوسنتز اسیدهای آمینه دارد. گزارش شده است که خوک‌های HFE توده عضلانی بیشتری در مقایسه با خوک‌های LFE در ماهیچه سینه خود جمع کرده‌اند (Xu *et al.*, 2020). این افزایش در توده عضلانی نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای منتهی به ساخت پروتئین و اسیدآمینه است که موجب افزایش حجم و وزن عضله اسکلتی می‌شوند.

بیان بالاتر ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 در حیوانات HFE نسبت به حیوانات LFE نشان‌دهنده فعال شدن مسیر بیوسنتز اسیدآمینه سرین است که خود این اسیدآمینه می‌تواند پیش سازهایی را برای چرخه کربس و بیوسنتز پورین فراهم کند (شکل ۳). گلوکز منبع اصلی انرژی متابولیک در بدن است. وقتی گلوکز وارد سلول می‌شود، گلیکولیز در سیتوپلاسم شروع می‌شود. مسیر گلیکولیز و کاتابولیسم گلوتامین یک متابولیت میانی به‌نام ۳– فسفوگلیسرات ایجاد می‌کند که به‌تدریج توسط PHGDH، PSAT1 و PSPH به سرین کاتالیز می‌شود. در نهایت، سرین به گلیسین تبدیل می‌شود (Pan *et al.*, 2021).



شکل ۳– مسیر بیوسنتز سرین

Figure 3 - Serine biosynthesis pathway

3-PG: ۳–فسفوگلیسرات، 3-PHP: ۳–فسفوهیدروکسی پیروات، 3-Pser: ۳–فسفوسرین، TCA: اسید تری کربوکسیلیک

3-PG: 3-Phosphoglycerate, 3-PHP: 3-Phosphohydroxy pyruvate, 3-Pser: 3-Phosphoserin, TCA: Tricarboxylic acid

در حیوانات با بازده غذایی بالاتر، مسیر بیوسنتز سرین فعال‌تر است و در نتیجه، حیوانات HFE توانایی بالاتری در استفاده بهتر از منابع انرژی مانند گلوکز نسبت به حیوانات LFE دارند. مسیر بیوسنتز سرین موجب افزایش تولید آمینواسیدها و افزایش پروتئین‌سازی در بافت عضله سینه می‌شود. بنابراین، انرژی به‌دست آمده به‌جای اینکه به‌صورت چربی ذخیره شود، به‌صورت پروتئین ذخیره می‌شود و موجب افزایش حجم و وزن بافت عضله در بوقلمون‌های HFE می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

شناخت اساس و بنیان مولکولی صفت بازده غذایی به شناسایی بیومارکرهای مهم و استفاده از آن‌ها در استراتژی‌های اصلاح نژادی

بسیار کمک می‌کند. انتخاب حیوانات با بازده غذایی بهتر موجب کاهش هزینه‌های پرورش و آلودگی‌های زیست محیطی می‌شود. مسیر بیوسنتز سرین یکی از مسیرهای مهم در بازده غذایی است. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین (PHGDH ،PSPH و PSAT1) در بوقلمون‌های بازده غذایی بالا به‌طور معنی‌داری بالاتر از بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین بود. در واقع، این نتایج در سطح بیولوژی مولکولی نشان می‌دهند که بوقلمون‌ها با بازده غذایی بالاتر استفاده بهتری از انرژی دریافتی از خوراک در طول دوره پرورش می‌نمایند. فعال شدن این مسیر موجب افزایش بیوسنتز اسیدهای آمینه مختلف و در نتیجه، افزایش پروتئین و توده عضله در پرندگان می‌شود. نتایج این پژوهش می‌تواند پنجره‌ای امیدبخش جهت معرفی ژن‌های اثرگذار بر صفت بازده غذایی به‌منظور بررسی بیشتر در سطح جمعیت و گله‌های بزرگ‌تر پرندگان باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۵۸۳۶۶۱۱ و کمک مالی شماره ۹۸۰۳۰۴ ستاد توسعه زیست فناوری انجام شده است.

References

1. Aggrey, S. E., Karnuah, A. B., Sebastian, B., & Anthony, N. B. (2010). Genetic properties of feed efficiency parameters in meat-type chickens. *Genetic Selection Evolution*, *42*, 25. https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-25
2. Artegoitia, V. M., Foote, A. P., Lewis, R. M., & Freetly, H. C. (2019). Metabolomics profile and targeted lipidomics in multiple tissues associated with feed efficiency in beef steers. *ACS Omega*, *4*(2), 3973-3982. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02494
3. Bottje, W., & Carstens, G. (2009). Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of Animal Science*, *87*(suppl_14), E48-E63. https://doi.org/10.2527/jas.2008-1379
4. Case, L. A., Wood, B. J., & Miller, S. P. (2012). The genetic parameters of feed efficiency and its component traits in the turkey (Meleagris gallopavo). *Genetic Selection Evolution*, *44*, 2. https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-2
5. Ebrahimzadeh-Allahabad, A., Mahmodian, Z., Pezeshkian, Z., & Mollaei, A. (2015). Estimation of genetic and phenotypic parameters of some important economic traits in Khazak native hen in Iran. *Animal Genetic Resources/Resources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales, 57*: 99-103. https://doi.org/10.1017/S2078633615000272
6. Fonseca, L. D., Eler, J. P., Pereira, M. A., Rosa, A. F., Alexandre, P. A., Moncau, C. T., Salvato, F., Fernandes, L. R., Palmisano, G., Ferraz, J. B. S., & Fukumasu, H. (2019). Liver proteomics unravel the metabolic pathways related to feed efficiency in beef cattle. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41813-x
7. Gong, S. (2010). Identification of nover growth signalling pathway in sheep skeletal muscle by comparative microarray analysis. Doctoral dissertation. University of Nottingham. The UK.
8. Kong, B. W., Song, J., Lee, J., Hargis, B., Wing, T., Lassiter, K., & Bottje, W. (2011). Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes. *Poultry Science*, *90*(11), 2535-2547. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01435
9. Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X., & Wang, H. (2021). Serine, glycine and one‑carbon metabolism in cancer. *International Journal of Oncology*, *58*(2), 158-170. https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5158
10. Parr, T., Al-Doski, S., Hemmings, K., Daniel, Z., Brown, D., Lu, C., Hodgman, C., May, S., & Brameld, J. (2015). Increased expression of serine biosynthetic pathway genes is associated with skeletal muscle hypertrophy in sheep. *Proceedings of the Nutrition Society*, *74*(OCE2). https://doi.org/10.1017/S0029665115002013
11. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9): e45-e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45
12. Pirani, N., Elyasi Zarringhabaei, G. H., & Taghizadeh, A. (2010). Genetic relationship of 6 Iranian native chicken populations using RAPD markers. *Animal Science Researches, 19*(1), 69-79 .
13. Richards, M. (2003). Genetic regulation of feed intake and energy balance in poultry. *Poultry science*, *82*(6), 907-916. https://doi.org/10.1093/ps/82.6.907
14. Salahi, A. (2014). A review of the turkey meat production industry in Iran. *Zootec International*, *36*, 24-29.
15. Wang, X., & Kadarmideen, H. N. (2019). Metabolomics analyses in high-low feed efficient dairy cows reveal novel biochemical mechanisms and predictive biomarkers. *Metabolites*, *9*(7): 151. https://doi.org/10.3390/metabo9070151
16. Willems, O. W. (2014). Evaluation methods and technologies for improving feed efficiency in the turkey (Meleagris gallopavo). Doctoral dissertation. University of Guelph. Guelph. Canada.
17. Willems, O. W., Miller, S. P., & Wood, B. J. (2013). Assessment of residual body weight gain and residual intake and body weight gain as feed efficiency traits in the turkey (Meleagris gallopavo). *Genetics Selection Evolution*, *45*(1), 26. https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-26

18. Xu, C., Wang, X., Zhuang, Z., Wu, J., Zhou, Sh., Quan, J., Ding, R., Ye, Y., Peng, L., Wu, Z., Zheng, E., & Yang, J. (2020). A transcriptome analysis reveals that hepatic glycolysis and lipid synthesis are negatively associated with feed efficiency in DLY pigs. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66988-6
19. Yang, H., Huang, X., Fang, S., He, M., Zhao, Y., Wu, Z., Yang, M., Zhang, Zh., Chen, C., &Huang, L. (2017). Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1555. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01555
20. Zhou, N., Lee, W. R., & Abasht, B. (2015). Messenger RNA sequencing and pathway analysis provide novel insights into the biological basis of chickens' feed efficiency. *BMC Genomics*, *16*(1), 1-20. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1364-0